

1-F-10

TRANSFORMATION OF TOMATO

Patent Number: JP4222527
Publication date: 1992-08-12
Inventor(s): KOMARI TOSHIHIKO; others: 02
Applicant(s): JAPAN TOBACCO INC
Requested Patent: JP4222527
Application Number: JP19900411681 19901219
Priority Number(s):
IPC Classification: A01H1/00; C12N1/21; C12N15/29; C12N15/67
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To provide a transformation process for tomato having high transformation efficiency and little risk of teratogeny.
CONSTITUTION: A plasmid containing a DNA originated from a virulence region of a tumor-inducing plasmid pTiBo542 of *Agrobacterium tumefaciens* is introduced into the bacterial cell and a tomato is transformed with the transformed *Agrobacterium tumefaciens* containing introduced plasmid.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

特開平4-222527

(43) 公開日 平成4年(1992)8月12日

(51) Int. Cl. ³	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 H 1/00	A	8502-2B		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
		15/29		
		15/67		
// C 1 2 N 1/21				

審査請求 未請求 請求項の数3 (全 5 頁) 最終頁に続く

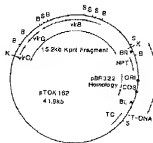
(21) 出願番号	特願平2-411681	(71) 出願人	000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都品川区東品川4丁目12番82号
(22) 出願日	平成2年(1990)12月19日	(72) 発明者	小鞠 敏彦 静岡県豊田郡豊田町東原700 日本たばこ 産業遺伝育種研究所内
		(72) 発明者	斉藤 晴人 静岡県豊田郡豊田町東原700 日本たばこ 産業遺伝育種研究所内
		(72) 発明者	神代 隆 静岡県豊田郡豊田町東原700 日本たばこ 産業遺伝育種研究所内
		(74) 代理人	弁理士 谷川 英次郎

(54) 【発明の名称】 トマトの形質転換方法

(57) 【要約】

【目的】 形質転換効率が高く、奇形植物が生じるおそれが少ないトマトの形質転換方法を提供する。

【構成】 細菌の *Agrobacterium tumefaciens* の腫瘍誘導性プラスミド pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA を含有するプラスミドを導入した *Agrobacterium tumefaciens* でトマトを形質転換する。



【注】 記号: KpnI, KpnI; XbaI, XbaI; SmaI, SmaI; PstI, PstI; EcoRI, EcoRI; SalI, SalI. 記号の付いた領域は、その酵素で切断される領域を示す。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Agrobacterium tumefaciens* の T プラスミド pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA 領域を含むプラスミドを導入した *Agrobacterium tumefaciens* でトマトを形質転換することから成るトマトの形質転換方法。

【請求項2】 前記 pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA は、virB、virG 及び virC 遺伝子を含む請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記 T プラスミド pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA を含有するプラスミドは pTK162 である請求項2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はトマトの形質転換方法に係り、特に、細菌の *Agrobacterium tumefaciens* を用いたトマトの形質転換方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 トマトは主要作物の1つであり、その品種改良は重要である。トマトの品種改良を形質転換法により行うことが従来より研究されている。従来より、トマトの形質転換方法として、細菌の *Agrobacterium tumefaciens* を用いた方法がいくつか報告されている（マコーミックら著、Plant Cell Report 5:81-84、1987年、チイ及びフィリップス著、Plant Cell Report 6:105-108、1987年、デ・ブロックラ著、EMBO J. 6:2513-2518、1987年）。この *Agrobacterium tumefaciens* は植物細胞を形質転換し、腫瘍化する能力を有する土壌細菌であり、この細菌には腫瘍誘導性プラスミド（T プラスミド）が含まれている。T プラスミドにおいて重要な部位は形質転換に関与する領域であるヴィレンス領域と、植物細胞に転移される腫瘍化遺伝子が含まれている T 領域である。そして、T 領域においては、腫瘍化遺伝子の転移に必須の部分は T 領域においてその両端に位置する境界配列と呼ばれる領域のみである。*Agrobacterium tumefaciens* としては、これまで多くの菌株が単離されており、その中で LBA4404 という菌株は T 領域が除去された T プラスミドを有する非腫瘍誘導性菌株であり、形質転換に用いるのに都合がよい。また、A281 という菌株は、特に強効原性であると知られており、形質転換効率が極めて高い。この性質は、A281 に含まれる T プラスミド pTiBo542 のヴィレンス領域の能力が高いことによる（フッドら、Bio/Technol. 2:702-709、1984年、フッドら、J. Bacteriol. 168:1283-1209、1986年、コマリら、J. Bacteriol. 166:88-94、1986年、ジンラ、J. Bacteriol. 169:4417-4425、1987年、コマリ、Plant Science 60:223-229、1989年）。従って、この A281 という菌株を植物の形質転換実験に使用することも可能である。

2

【0003】 一般に、*Agrobacterium tumefaciens* を用いたトマトの形質転換方法において、トマトを導入しようとする DNA 断片は T プラスミドの T 領域の2つの境界配列の間に配置される。この DNA 断片は *Agrobacterium tumefaciens* 中において T プラスミド又は他のプラスミド上に配置され、この細菌中の T プラスミドのヴィレンス領域中の遺伝子の機能により植物細胞に転移されるものである。そして、従来の技術においては、ヴィレンス領域の遺伝子としては、*Agrobacterium tumefaciens* に内在する T プラスミドのみが利用されていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、LBA4404 を用いたトマトの形質転換方法においては、形質転換の効率が極めて低い場合があり、また、品種によっては形質転換が著しく困難である。また、A281 を用いた形質転換方法においては、LBA4404 を用いた形質転換方法よりも形質転換効率は高いが、奇形植物が出現する例もあった。本発明は上述した点に鑑みて創案されたものであり、形質転換の効率の高いトマトの形質転換方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本願発明者は効率の高いトマトの形質転換方法について鋭意研究を行った結果、pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA 断片を含有するプラスミドを導入した *Agrobacterium tumefaciens* を用いることにより高効率でトマトの形質転換を行うことができることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、*Agrobacterium tumefaciens* の T プラスミド pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA 領域を含むプラスミドを導入した *Agrobacterium tumefaciens* でトマトを形質転換することから成るトマトの形質転換方法を提供する。

【0006】 以下、本発明について詳細に説明する。上述のように、本発明の方法においては、T プラスミド pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA 領域を含有するプラスミドを用いる。pTiBo542 は、上記したように、フッドら、ジンラ及びコマリらの各文献に記載された公知のプラスミドであり、American Type Culture Collection（受託番号 37349）から入手可能なものである。pTiBo542 のヴィレンス領域には virB、virC、virG などの遺伝子が存在するが、pTiBo542 を制限酵素 Ssp I で切断すると、virB、virC 及び virG 遺伝子を含む 15.2 kb の断片が得られ、これを pTiBo542 のヴィレンス領域由来の DNA 領域として利用することができる。

【0007】 一方、本発明の方法において、*Agrobacterium tumefaciens* に導入されるプラスミドは、T プラスミドの T 領域を有する DNA 領域を含む。T 領域は、T プラスミドまたはそれから誘導された公知の各種プラスミド中に含まれており、また、このような T 領域中

に適切な制限酵素部位を有するものも知られているので、このようなプラスミドに上記ウイルス領域由来DNA領域を組み込むことにより、*Agrobacterium tumefaciens* に導入すべきプラスミドを構築することができる。

【0008】下記実施例においては、pTiBo542のウイルス領域由来のクローン化されたDNA断片を含有するプラスミドの一例として、pTOK162を構築した。その構造を図1に示す。このプラスミドは、太陽菌及び*Agrobacterium tumefaciens* 中で増殖可能であるpTOK154と呼ばれるプラスミド(T1プラスミドから誘導された公知のpGA472プラスミドとpVCK101と呼ばれる公知の広宿主域プラスミドから後述の方法により構築された、T領域を含むプラスミド)にpTiBo542のウイルス領域由来の既にクローン化されていた上記15.2キロボースのKpnI断片(virB、virG、virC各遺伝子を含む)を組み込んだものである。このpTOK154には、T領域の2つの境界配列とその間にトマトに導入しようとする遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子が配列されており、本実施例は、トマトに導入しようとする遺伝子がpTiBo542のウイルス領域由来のクローン化されたDNA断片を含有するプラスミド上に配置されている例である。

【0009】トマトに組み込もうとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、プラスミドが有する薬剤耐性等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。もっとも、第1図に示すpTOK162のように、大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをT領域内に導入することが必ずしも容易ではないことがある。このような場合には、*Agrobacterium tumefaciens* 細胞内のin vivo 系での相同組換え(ヘレラ-エステラら、EMBO J.2:987-995、1983年、ホーチラ、Science、223:496-498、1984年)を利用することにより、目的のDNAをpTOK162に導入することが可能になる。すなわち、例えば、まず、pTOK162を*Agrobacterium tumefaciens* に導入して、この菌にさらに所望DNAを導入したpBR322と呼ばれるプラスミド(類似のプラスミドを含む)を導入する。pTOK162のDNAにはpBR322と相同部分があるので、pBR322誘導体は相同配列を介した組み換えによりpTOK162に組み込まれることになる。pBR322はpTOK162と異なり*Agrobacterium tumefaciens* 中では複製できないので、このような組み込まれた状態(pTOK162:pBR322誘導体という)でなければ*Agrobacterium tumefaciens* 中で生存することができない。そして、pTOK162とpBR322誘導体のそれぞれに特異的な酵素(薬剤耐性等)について選抜すれば、pTOK162:pBR322誘導体を有する*Agrobacterium tumefaciens* を得ることができる。さらに、pTOK162を有する*Agrobacterium tumefaciens* に各種のプラスミドを導入して研究したところ、pBR322誘導

体の選抜マーカーとしては、トランスポゾンTn7(デグリーブラ、Plasmid 6:235-248、1981)由来のスペクトノマシリン耐性遺伝子(streptomycin/spectinomycin phosphotransferase, SPT)が優れていることが判明した。従って、すでに所望の遺伝子がpBR322にクローン化されている場合には、SPT遺伝子をそのプラスミドに挿入すれば、*Agrobacterium tumefaciens* 内の相同組換えにより、pTOK162のT領域に所望の遺伝子を導入することができる。またその他の場合には、pBR322由来のDNAとSPT遺伝子から構成されるプラスミドを用意しておいて、これに所望の遺伝子を挿入する方法も考えられる。この際、T領域の境界配列を活用すれば、最終的に、pTOK162上において、カナマイシン耐性遺伝子と所望の遺伝子を別々のT領域中に配置することも可能である。カナマイシン耐性をマーカーとして植物を形質転換した場合、両T領域とも導入される場合も相当の比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分達成できる。また、両T領域が別々の染色体に組み込まれる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子から分離することも可能となる。

【0010】プラスミドを*Agrobacterium tumefaciens* に導入する操作は従来法により行うことができ、例えば、細菌の三叉交雑手法(ディッター、Pro.Natl.Acad.Sci.USA、77:7347-7351、1980年)により行うことができる。

【0011】このようにして調製される*Agrobacterium tumefaciens* には、pTOK162由来のウイルス能力の高いDNAが含まれるので、高い効率でトマトの形質転換を行うことが可能である。また、本発明においては病原性の高いA281のような菌種を直接的に用いるものではないので、奇形等が生じるおそれ小さい。

【0012】尚、本発明においては、トマトに導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様にT領域の境界配列の間に配置されるものであるが、*Agrobacterium tumefaciens* 中で、T1プラスミド上に配置されてもよく又は他のプラスミド上に配置されてもよい。

【0013】本発明において、トマトの形質転換は、従来法と同様に行うことができる。例えば、上記プラスミドを導入した*Agrobacterium tumefaciens* とトマトの子葉断片を液体培地中で共存培養すること等により行われる。

【0014】

【発明の効果】以上のように構成した本発明によれば、*Agrobacterium tumefaciens* pTiBo542由来のウイルス能力が高いDNAが導入されているので、高効率でトマトの形質転換を行うことが可能になるという効果が奏される。また、直接的に病原性の高い菌種を用いるものではないので、トマトの形質転換を行う際、奇形等が生じるおそれ小さいという効果が奏される。

【0015】

5

【実施例】以下、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、下記実施例において、各操作は、特に断りが無い限り、ティーマニアティスから、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982に記載の方法により行った。

【0016】(1) pTOK162 の調製

広宿主域プラスミドであるpVCK101 (ナウフとネスター、Plasmid 8:45-54, 1982年、ネスターより入手可能) からEco RI部位を取り除くため、これをEco RIで切断し、クレノウ酵素処理により末端を平滑末端とした後、再び環状化した。また、バイナリーベクターであるpGA472 (アンラ、EMBO J. 4:277-284, 1985年に記載、アンラより入手可能) をHind IIIとBgl IIで切出し、クレノウ酵素処理後再び環状化することによって、T領域からHind III、BamHI、Sal I、Bgl IIの各認識部位を除去した。この分子から、T領域を含むSal I断片を取り出し、クレノウ酵素処理後、Hind III、Sal I、Xba I、BamHI、Kpn I、Sac Iの各認識部位を有する合成リンカーDNAを結合させ環状化した。さらに、これをSal Iにより開環し、上記のpVCK101 誘導体のXho I部位とHind III部位の間に挿入しpTOK164を作製した。この操作を図2に示す。上記の記載からわかるように、pTOK164は、T領域外にSsi I、Kpn I、Xba I、Bgl II及びHind III、Sal Iの唯一の認識部位を持っている。また、pVCK101のEco RI部位を除去したので、T領域内に唯一のEco RI部位が存在する。この部位に外來DNA断片を挿入し、植物ゲノムに導入することができるので、他の実験にも応用可能である。一方、pTiBo542をKpn Iで消化し、ヴィルレンス領域内のvirB、virG及びvirC遺伝子を含む15.2 kbの断片を切り出し、これをpUC19のKpn I部位に挿入し、クローニングした。これを、上記pTOK164のKpn I部位に挿入し、図1に示すpTOK162を作製した。

【0017】(2) pTOK162 のAgrobacterium tumefaciens 内への導入

このようにして得られたpTOK162をAgrobacterium tumefaciensの菌株LBA4404 (文献:ホエケマ、Nature, 303:179-180, 1983年) に導入し、LBA4404(pTOK162)を得た。導入は、上記の三系交雑手法により行った。

【0018】(3) トマトの形質転換

LBA4404 (pTOK162) を得て、トマトの形質転換実験を

6

行い、LBA4404 (pGA482) と比較した。尚、このpGA482というプラスミドはpTiBo542由来のDNAを含まないプラスミドである。形質転換は、トマト品種モモタロウの種子を滅菌し、無菌的に発芽させた植物の子葉を材料として行った。すなわち、Linsmaier and Skoog (1965年)の無機塩類と30 g/lのグルコースよりなる液体培地中でこの子葉の断片約1 gと、Agrobacterium tumefaciens 約10⁸ 細胞とを48時間共存培養した。そして、子葉断片を洗浄し、細菌を洗い落とし、子葉断片をカナマイシン100 mg/l、セフトキシム250 mg/l、インドール酢酸0.3 mg/l、イソペンチルアデニン10 mg/lを含む寒天(0.9%)培地に置出し、15日間培養を行った。その結果、KBA4404(pTOK163)で処理した子葉断片108個のうち、41個の断片からカナマイシン耐性のカルスが出現した。また、これらのカルスを、上記寒天培地で引き続き25日間培養し、カナマイシン耐性の芽葉を得た。これらの芽葉をリンスマイヤーとスクーグ(1965年)の無機塩類と30 g/lのショ糖を含む寒天培地に移植することによって再分化植物を誘導したところ、1カルスにつき2個体の頻度で再分化植物が得られた。また、対照として、LBA4404(pTOK162)で処理するかわりに、LBA4404(pTOK482)で処理した子葉断片を用いて同様の実験を行った。その結果、120個の断片を試したにもかかわらず、カナマイシン耐性カルスは全く出現しなかった。以上の結果から、LBA4404(pTOK162)で処理することにより、約4割の子葉断片よりカナマイシン耐性の形質転換植物が得られたのに対し、LBA4404(pTOK482)で処理を行っても形質転換植物は全く得ることはできず、本発明の効果は明かであった。

【0019】尚、本発明は以上の実施例に限定されるものでなくその主旨を逸脱しない範囲で適宜変更を加えることが可能である。例えば、Agrobacterium tumefaciens 中にT1プラスミドと、バイナリーベクターと、pTiBo542由来のDNA断片を含むプラスミドの計3個のプラスミドを同居させることも可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 pTOK162 プラスミドの構造を示す図。

【図2】 pTOK162 プラスミドの中間体であるpTOK164を構築する操作を示す図。

